پتانسیل بازدارندگی برخی جدایه‌های قارچ‌های آنتاگونیست روی قارچ *Cercospora beticola*، عامل بیماری لکه برگی سرکوسپورایی چغندرقند در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

سمیه موسوی[۱] و مهدی ارزنلو[۲*]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۲- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

* مسئول مکاتبه: arzanlou@hotmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۲ تاریخ پذیرش : ۹۴/۶/۹

چکیده

در مطالعه‌ی حاضر، پتانسیل آنتاگونیستی عوامل قارچی ساکن ریزوسفر چغندرقند علیه قارچ *Cercospora beticola*، عامل بیماری لکه برگی سرکوسپورایی چغندرقند مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، ۱۵ جدایه‌ی قارچی از ناحیه‌ی ریزوسفر گیاه چغندرقند جداسازی گردید. پس از غربال اولیه اثر آنتاگونیستی جدایه‌ها، سه جدایه قارچی برای سنجش اثر آنتاگونیستی بر *C. beticola* انتخاب شدند. جدایه‌ها بر اساس داده‌های توالی ناحیه ITS-rDNA مورد شناسایی قرار گرفتند. هویت جدایه‌های قارچی *Trichoderma harzainaum*، *Acremonium strictum* و *Geliocepahlis* sp. تعیین گردید. علاوه بر این، سه جدایه‌ی قارچی آنتاگونیست شامل *T. harzianum* (S1)، *T. harzianum* (T22) و *Hansfordia pulvinata* (Ha) نیز در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از این مطالعه، نشان داد که تمامی جدایه‌های آنتاگونیست در مقایسه با شاهد به صورت معنی‌دار اثر بازدارندگی از رشد روی *C. beticola* داشتند. در آزمون‌های کشت متقابل و متابولیت‌های ثانویه فرار، *T. harzianum* T22 بیشترین درصد بازدارندگی و جدایه‌های *A. strictum* و *Gliocephalis* sp. کمترین اثر بازدارندگی را روی *C. beticola* نشان دادند. در آزمون متابولیت‌های غیرفرار (اتوکلاو شده و اتوکلاو نشده) بیشترین و کمترین درصد بازدارندگی به ترتیب برای جدایه‌های *T. harzainaum* و *A. strictum* بود. پتانسیل آنتاگونیستی جدایه‌های *Trichoderma* تحت شرایط گلخانه‌ای در سه حالت شامل کاربرد آنتاگونیست قبل، همزمان و بعداز مایه‌زنی برگ‌های چغندر قند با *C. beticola* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که هر سه جدایه‌ی *Trichoderma* به طور معنی داری، میزان بیماری ایجاد شده به وسیله *C. beticola* را در مقایسه با شاهد کاهش دادند.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی، توالی ناحیه ITS-rDNA، چغندرقند.

مقدمه

بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی یکی از مهمترین بیماری‌های برگی چغندرقند در مناطق کشت این محصول به شمار می‌رود. این بیماری به‌ویژه در مناطق با آب و هوای گرم و مرطوب شیوع داشته و ازجمله عوامل محدود کننده تولید محصول به شمار می‌رود و خسارت قابل توجهی از نظر کمی و کیفی به زراعت چغندرقند وارد می‌کند (هولت اسکالت ۲۰۰۰). خسارت ناشی از این

بیماری با کاهش در وزن ریشه، درصد قند و افزایش ناخالصی‌ها همراه است که منجر به پایین آمدن عملکرد ریشه و همچنین کاهش کمیت و کیفیت شکر استحصالی می‌شود (روسی و همکاران ۲۰۰۰). در ایران بیماری لکه-برگی سرکوسپورایی چغندرقند از مناطق خوزستان، کرانه‌های دریای خزر، اردبیل، ارومیه، بجنورد، مزارع دشت مغان، داراب، خوی و استان گلستان گزارش گردیده است (ارشاد ۱۳۸۸، بخشی و همکاران ۲۰۱۲). مرحله جنسی عامل بیماری هنوز مشخص نشده است ولی مطابق قوانین جدید نامگذاری قارچها Sacc. *Cercospora beticola* به عنوان نام معتبر این گونه انتخاب شده است. این گونه براساس داده های مولکولی در خانواده Mycospharellaceae، راسته Capnodiales واقع شده است (بخشی و همکاران ۲۰۱۵).

راهبردهای مختلفی برای مدیریت این بیماری اعمال می‌شود که روش‌های زراعی از قبیل جمع‌آوری و انهدام بقایای بوته‌های آلوده، رعایت تناوب زراعی حداقل برای مدت سه سال، وجین و دفع علف‌های هرز، کشت ارقام مقاوم و استفاده از ترکیبات شیمیایی را شامل می‌شود (ویندلز و همکاران ۱۹۹۸). استفاده از ارقام مقاوم جهت کنترل بیماری به دلایل اقتصادی و زیست محیطی حائز اهمیت بوده و بر کنترل شیمیایی ارجحیت دارد (اسمیت ۱۹۸۵، میلر و همکاران ۱۹۹٤). با این وجود، با توجه به طبعیت پلی‌ژنیک مقاومت ارقام چغندرقند به بیماری لکه برگی سرکوسپورایی و صفات زراعی نامرغوب ارقام چغندرقند با سطح مقاومت بالا نسبت به این بیماری، تولید کنندگان به دلیل بازده پایین ارقام مقاوم تمایل به استفاده از آنها را ندارند (روسی و همکاران ۱۹۹۹، بورزی و همکاران ۲۰۰۸). گروه‌های مختلف قارچ‌کش‌ها از قبیل بنزیمیدازول (توپسین ام)، قارچ‌کش‌های محافظتی (سوپرتین، آگرتین، دیاتان ام ٤٥، پنکوزب)، بازدارنده‌های بیوسنتزی استرول (ایمیننت) یا قارچ‌کش‌های استروبیلورین به طور متناوب برای کنترل این بیماری به کار می‌روند. با وجود اینکه، این قارچ‌کش‌ها در مدت زمان کوتاه در کنترل لکه برگی سرکوسپورایی موثر هستند اما در طولانی مدت امکان بروز مقاومت در جمعیت‌های بیمارگر نسبت به این قارچکش‌ها وجود دارد (لارتی ۲۰۰۳). با توجه به محدودیت‌های روش‌های ذکر شده در مدیریت موثر بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی چغندرقند، استفاده از روش‌های جایگزین و یا تلفیق آنها در مدیریت این بیماری ضروری به نظر می‌رسد (لارتی ۲۰۰۳، استفانیا و همکاران ۲۰۰۸). تعیین دامنه‌ی میزبانی عامل بیماری جهت شناسایی میزبان‌های تناوبی و زمستان‌گذران و استفاده از عوامل آنتاگونیست جهت کنترل زیستی عامل بیماری به عنوان راهبردهای جدید مدیریت این بیماری مطرح می‌باشند (لارتی ۲۰۰۳، بورزی و همکاران ۲۰۰۸).

کنترل زیستی یک راهکار جدید برای کنترل بیماری لکه برگی سرکوسپورایی چغندرقند می‌باشد. مطالعات محدودی در زمینه‌ی کنترل زیستی بیماری لکه برگی سرکوسپورایی انجام گرفته است (لارتی ۲۰۰۳، کولینز و جاکوبسن ۲۰۰۳). از آنجاییکه قارچ *C. betiocola* یک بیمارگر اندام‌های هوایی است، تلاش‌های قبلی در خصوص کنترل زیستی این بیماری با تکیه بر استفاده از آنتاگونیست‌های برگ بوده است (لارتی ۲۰۰۳، کولینز و جاکوبسن ۲۰۰۳). با این حال استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست ساکن خاک برای کاهش مایه‌ی تلقیح عامل بیماری در خاک و بقایای گیاهی به عنوان یک رویکرد جدید در مدیریت این بیماری مطرح است. ارزیابی‌های انجام شده در مورد توانایی قارچهای آنتاگونیست ساکن در خاک از قبیل *Trichoderma virens*، *T. atroviride* و *T. harzianum* برای مقابله با *C. beticola* در آزمایشگاه با موفقیت همراه بوده است (لارتی ۲۰۰۳). گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* دارای اثر بازدارندگی روی

طیف وسیعی از قارچ‌های بیمارگر می‌باشند و در برنامه‌های مدیریت برخی از بیماری‌های قارچی گیاهان در کنار سایر روش‌های مدیریت بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند (لارتی ۲۰۰۳، بورمیستر ۲۰۰۸).

هدف از تحقیق حاضر بررسی فعالیت قارچ‌های آنتاگونیست جداسازی شده از ناحیه ریزوسفر بوته‌های چغندرقند آلوده و سالم و همچنین جدایه‌ی تجاری قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* و تاثیر آن‌ها در بازدارندگی از رشد *C. beticola* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

جهت تهیه‌ی جدایه‌های قارچ عامل بیماری و عوامل قارچی آنتاگونیست عامل بیماری در مهر ماه سال ۱۳۹۰، از پنج مزرعه چغندرقند در منطقه مغان از استان اردبیل بازدید به عمل آمد. نمونه‌برداری به صورت تصادفی از برگ‌های بوته‌های چغندرقند دارای علایم بیماری لکه برگی سرکوسپورایی و همچنین از خاک ناحیه ریزوسفر (عمق ۳۰-۲۰ سانتی‌متری) بوته‌های آلوده و سالم چغندرقند صورت گرفت.

جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های *C. beticola*

در زیر بینوکلر با استفاده از یک سوزن تلقیح استریل، توده‌ای از کنیدیوم‌های قارچ از محل لکه‌های برگی برداشته شد. جداسازی و خالص‌سازی به روش ترقیق اسپور صورت گرفت (ارزنلو و بخشی ۲۰۱۱، بخشی و همکاران ۱۳۹۱، ۲۰۱۱).

جداسازی قارچ‌های آنتاگونیست از خاک

از خاک هر منطقه یک گرم در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد و غلظت‌های مختلف به صورت سری تهیه گردید. از رقت‌های $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-٤}$ و $۱۰^{-٥}$ به اندازه ۵۰۰ میکرولیتر بر روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت عصاره سیب زمینی آگار[1] (PDA) منتقل گردید و تشتک‌های پتری در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ٤٨ تا ۷۲ ساعت نگهداری و مشاهده رشد قارچ‌ها، پرگنه‌های قارچ به تشتک های پتری حاوی محیط کشت تازه منتقل گردید. خالص‌سازی جدایه‌های قارچی با استفاده از روش نوک ریسه و یا تک اسپور صورت پذیرفت.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

استخراج DNA ژنومی

جدایه‌های قارچی در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت عصاره مالت آگار[2] (MEA) دو درصد کشت شده و در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز نگهداری شده و پس از رشد کافی جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA مطابق روش مولر و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد. کیفیت و کمیت DNA به دست آمده به روش اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

تکثیر نواحی ژنومی، توالی یابی و شناسایی مولکولی

ناحیه ژنومی شامل ناحیه فاصله‌انداز داخلی DNA ریبوزومی (ITS-rDNA) با استفاده از آغازگر رفت (ITS1 = 5'TCCGTAGTTGGACCTGCGG3') و برگشت (ITS4 = 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') در جدایه‌ها تکثیر شد (وایت و همکاران ۱۹۹۰). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش حاوی ۱۵-۱۰ نانوگرم DNA ژنومی الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش 10X، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۲/. میلی‌مولار هر یک از dNTP ها، پنج پیکومول از هر یک از آغازگرها، ۵/. واحد آنزیم DNA

[1]Potato Dextrose Agar (PDA).
[2]Malt Extract Agar (MEA).

پلی‌مراز و آب دوبار تقطیر استریل بود. تکثیر ناحیه‌ی ITS-rDNA با اعمال چرخه‌های حرارتی به قرار زیر انجام شد: یک چرخه‌ی دمایی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه، ۳۶ چرخه‌ی تکثیر، شامل واسرشت سازی در دمای ۹٤ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ٥٦ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ٤٥ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه‌ی بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد. فرآورده‌های واکنش روی ژل آگارز یک درصد حاوی ۱/. میکروگرم بر میلی‌گرم اتیدیوم-بروماید در بافر 1X TAE توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل تحت نور ماورا بنفش (طول موج ۳۱۲ نانومتر) مشاهده و بررسی شدند و محصول PCR برای توالی-یابی به شرکت انستیتوپاستور ایران فرستاده شد. داده های خام توالی بعد از ویرایش با نرم افزار سکمن (Lasergene package, DNAstar, Madison, USA)، با استفاده از نرم افزار بلاست (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) با توالی‌های موجود در بانک ژن و دیگر پایگاه‌های تخصصی داده-های توالی (TrichoBLAST) مقایسه و هویت جدایه‌های قارچی تعیین گردید.

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی علیه *C. beticola*

روش کشت متقابل

برای این منظورجدایه‌های قارچ آنتاگونیست و قارچ عامل بیماری بر روی محیط کشت PDA کشت داده شدند. یک حلقه پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه *C. beticola* به فاصله دو سانتی‌متر از لبه تشتک پتری قرار داده شد و در طرف مقابل حلقه‌ای به همین اندازه از کشت سه روزه جدایه‌های آنتاگونیست قرار داده شد. دور تشتک پتری توسط نوار پارافیلم بسته شد. در تیمارهای شاهد به جای قارچ آنتاگونیست از حلقه محیط کشت PDA استریل استفاده گردید و به این ترتیب در این آزمایش دو سری تیمار شاهد شامل قارچ آنتاگونیست به تنهایی و قارچ بیماری‌زا به تنهایی در نظر گرفته شد. کشت‌ها درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. آزمایش در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شده و اندازه-گیری شعاع رشد پرگنه هر ۲٤ ساعت تکرار گردید. یادداشت برداری تا زمانی که پرگنه تیمارهای شاهد به نزدیک لبه تشتک پتری برسند، ادامه یافت. به منظور تعیین درصد بازدارندگی از رابطه پیشنهادی ادینگتون و همکاران (۱۹۷۱) استفاده شد:

$$L(\%) = [(C-T)/C]\times 100$$

که در این فرمول L درصد بازدارندگی رشد قارچ بیماری‌زا، C شعاع رشد پرگنه در تیمار شاهد قارچ بیماری‌زا و T شعاع رشد پرگنه قارچ بیماری‌زای گیاهی در تعامل با قارچ آنتاگونیست می‌باشد.

بررسی اثر متابولیت‌های غیر فرار قارچ‌های آنتاگونیست

به منظور مطالعه اثر مواد غیر فرار و آنتی‌بیوتیک‌های ترشح شونده قارچ آنتاگونیست بر روی رشد قارچ عامل بیماری، روش ارائه شده توسط دنیس و وبستر (۱۹۷۱) مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت مایع PDB[1] تهیه شد و در هر ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ۱۰۰ میلی لیتر از این محیط ریخته شد. پس از سرد شدن محیط کشت، هر ارلن با چهار حلقه‌ی میسلیومی هفت میلی متری از کشت سه روزه جدایه آنتاگونیست مورد نظر (روی PDA) تلقیح شد. برای هر جدایه آنتاگونیست یک ارلن‌مایر در نظر گرفته شده و به ارلن‌مایر شاهد چهار حلقه هفت

[1]Potato Dextrose Broth (PDB).

میلی‌متری از محیط PDA سترون اضافه گردید. کشت‌ها به مدت هفت روز روی شیکر دورانی با ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. محتویات هر یک از ارلن‌ها به طور جداگانه ابتدا بوسیله‌ی کاغذ صافی و سپس بوسیله‌ی صافی‌های میکروبیولوژیک صاف شدند.

تاثیر متابولیت‌های غیر فرار قارچ‌های آنتاگونیست در بازدارندگی از رشد قارچ *C. beticola* در دو حالت غیر اتوکلاو شده و اتوکلاو شده ارزیابی شد. در حالت اتوکلاو شده، سوسپانسیون صاف شده با استفاده از صافی میکروبیولوژیک به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی گراد استریل گردید. سوسپانسیون حاصل در حالت رقیق نشده (۱۰۰ درصد) و رقیق شده در نسبت های حجمی متابولیت به محیط کشت (۷۵/۲۵، ۵۰/۵۰ و۲۵/۷۵) در شرایط استریل با محیط کشت PDA استریل که دمای ان به حدود ۴۰ درجه‌ی سانتی گراد رسیده بود، مخلوط گردید و پس از به هم زدن به میزان ۲۰ میلی‌لیتر در تشتک‌های پتری تقسیم گردید. یک حلقه پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه *C. beticola* در وسط محیط کشت قرار داده شد. دور تشتک‌های پتری با استفاده از نوار پارافیلم مسدود و تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی گراد نگهداری شدند. در حالت اتوکلاو نشده، ۱۵۰ میلی‌لیتر متابولیت صاف شده در شرایط استریل در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت، جهت تخریب اسپورهای باقی مانده در سپوسپانسیون قرار داده شد. سپس مشابه روش اتوکلاو شده به تهیه محیط های کشت و ارزیابی قدرت بازدارندگی متابولیت‌های غیر فرار روی رشد قارچ *C. beticola* اقدام گردید. این آزمایش در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. ۴۸ ساعت بعد از تلقیح، شعاع رشد پرگنه قارچ عامل بیماری در تیمارها به طور روزانه اندازه‌گیری و یادداشت برداری گردید. داده‌های بدست آمده به منظور تعیین میزان بازدارندگی قارچ *C. beticola* توسط قارچ آنتاگونیست در فرمول فوق‌الذکر وارد و پس از محاسبه درصد بازدارندگی، گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح یک درصد انجام شد.

بررسی اثر متابولیت‌های فرار قارچ‌های آنتاگونیست

به منظور مطالعه اثر ترکیبات فرار تولید شده توسط قارچ آنتاگونیست بر روی قارچ عامل بیماری‌زای گیاهی از روش ارائه شده توسط دنیس و وبستر (۱۹۷۱) استفاده شد. یک حلقه پنج میلی‌متری از کشت سه روزه هر کدام از جدایه‌های آنتاگونیست به طور جداگانه در وسط تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد و سپس در شرایط استریل بالای هر کدام از این تشتک‌های پتری، یک ظرف پتری PDA دیگر، به صورت وارونه که حاوی یک حلقه‌ی میسلیومی از کشت هفت روزه *C. beticola* بود قرار داده شده و دور تا دور آن دو ظرف با پارافیلم بسته شد. در تیمار شاهد یک حلقه‌ی پنج میلی متری از محیط PDA انتقال یافت و سپس روی آن تشتک پتری حاوی *C. beticola* قرار داده شد. این آزمایش در سه تکرار ودر قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. بعد از ۴۸ ساعت قطر پرگنه‌های قارچ *C. beticola* به طور روزانه اندازه گیری گردید و این کار تا زمانی که پرگنه تیمارهای شاهد به نزدیک لبه تشتک پتری برسد، ادامه داشت. داده‌های به‌دست آمده در فرمول فوق‌الذکر وارد و پس از محاسبه درصد بازدارندگی، گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد انجام شد.

بررسی تاثیر جدایه های قارچی آنتاگونیست در کنترل بیماری لکه برگی سرکوسپورایی چغندر قند در شرایط گلخانه

سه جدایه‌ی قارچ آنتاگونیست شامل *Trichoderma* (T22, S1, Ta) جهت ارزیابی پتانسیل آنها در کنترل بیماری لکه برگی سرکوسپورایی چغندرقند در شرایط گلخانه انتخاب شدند. از بین دو جدایه قارچ *C. beticola*، جدایه M1 که قدرت بیماری‌زایی بیشتری داشت برای انجام کار گلخانه‌ای انتخاب شد. کاربرد عوامل آنتاگونیست در سه حالت ۱) مایه‌زنی همزمان آنتاگونیست و عامل بیماری‌زا، ۲) مایه‌زنی اول آنتاگونیست و ۲٤ ساعت بعد از آن عامل بیماری‌زا و ۳) مایه زنی اول عامل بیماری‌زا و ٤۸ ساعت بعد آنتاگونیست صورت گرفت.

تهیه مایه تلقیح جدایه‌ی قارچ *C. beticola*

به منظور تهیه اسپور، جدایه مذکور بر روی محیط کشت V8 کشت داده شده و به مدت دو هفته در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از افزودن آب مقطر سترون، سطح پرگنه‌های قارچ با لوپ استریل خراش داده شده و با استفاده از لام گلبول شمار، غلظت سوسپانسیون حاصل پس از صاف کردن در حد $۲×۱۰^{٤}$ اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد. به سوسپانسیون اسپور تهیه شده به میزان ۰/۲٪ توئین ۸۰ اضافه گردید و سپس سوسپانسیون به سطح برگ‌ها اسپری شد (استفانیا و همکاران ۲۰۰۸).

تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح جدایه‌های *Trichoderma*

برای این منظور جدایه‌های *Trichoderma* بر روی محیط کشت PDA کشت داده شده و به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. سطح پرگنه‌های قارچ پس از افزودن آب مقطر سترون، خراش داده شد و سوسپانسیون اسپور جمع آوری گردید. غلظت سوسپانسیون حاصل پس از صاف کردن در حد $۱×۱۰^{٦}$ اسپور در میلی‌لیتر جهت مایه زنی تهیه شد. به سوسپانسیون اسپور تهیه شده، به میزان ۰/۲٪ درصد توئین ۸۰ اضافه گردید و سپس سوسپانسیون به سطح برگ‌ها اسپری شد (استفانیا و همکاران ۲۰۰۸).

تهیه گیاه چغندر قند و مایه زنی

آزمایشات گلخانه‌ای طی ماه‌های تیر تا آذر ۱۳۹۲ در یکی از واحدهای گلخانه گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز انجام شد. خاک زراعی مورد استفاده برای کاشت بذر چغندرقند به نسبت ۱:۲ با کوکوپیت مخلوط شد و در دمای ۱۲۰ درجه‌ی سانتی-گراد، فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو شد (عمل اتوکلاو برای استریل بهتر خاک ۲٤ ساعت بعد تکرار شد). تعداد پنج عدد بذر چغندر (رقم رسول) پس از ضدعفونی سطحی با محلول تجاری هیپوکلریت سدیم (۱۰ درصد)، در داخل گلدان‌های پلاستیکی کاشته شد. بعد از اینکه گیاهچه‌ها سبز شدند تنها یک گیاهچه جهت مایه‌زنی نگه‌داری و بقیه حذف شدند. دمای گلخانه طی انجام آزمایش روی ۳۰-۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۹۰-۸۰٪ تنظیم گردید. برای هر جدایه آنتاگونیست سه گلدان در نظر گرفته شده و سه گلدان نیز به عنوان شاهد انتخاب شد. مایه‌زنی زمانی که گیاهان چغندرقند ۱٤-۱۲ برگی بودند، انجام گردید. با توجه به اهمیت سن برگ‌ها در حساسیت به بیماری لکه برگی سرکوسپورایی، در این ارزیابی سعی شد که همه گیاهان دارای برگ‌های هم‌سن و بالغ باشند. ارزیابی میزان بازدارندگی بیماری هفت روز بعد از مایه زنی و با استفاده از دستگاه تعیین شاخص سطح برگ در دو مرحله شامل اندازه گیری کل سطح برگ و اندازه گیری

مساحت بخش‌های سالم و سپس تفاضل این دو مقدار صورت گرفت. به این ترتیب که پس از اندازه گیری مساحت کل برگ (بر حسب سانتی‌متر مربع) قسمت‌های آلوده برگ (قسمت‌های نکروزه شده و بافت مرده) توسط اسکالپل نوک تیز برش داده شد و مساحت برگ بدون این بخش نیز محاسبه شد و در نهایت درصد بازدارندگی از بیماری محاسبه گردید. طرح پایه در تمام آزمون‌ها کاملا تصادفی بود. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام گرفت. تحلیل‌های آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و ترسیم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد (خدایی و همکاران ۱۳۹۲).

نتایج

شناسایی عوامل آنتاگونیستی جداسازی شده

در مجموع ۱۵ جدایه‌ی قارچی از ناحیه ریزوسفر گیاه چغندرقند جداسازی شد. پس از ارزیابی اولیه پتانسیل آنتاگونیستی جدایه‌ها بر علیه قارچ *C. beticola* در آزمایشگاه، چهار جدایه‌ی قارچی که از توان آنتاگونیستی بالاتری برخوردار بودند، به همراه سه جدایه‌ی قارچی تهیه شده از کلکسیون آزمایشگاه قارچ‌شناسی، جهت مطالعات تکمیلی انتخاب شدند. شناسایی جدایه‌های قارچی بر اساس داده های توالی ناحیهITS-rDNA انجام گرفت. نتایج مربوط به مقایسه داده‌های توالی ناحیه-ITS rDNA با داده های توالی موجود در بانک ژن در جدول شماره ۱ ذکر شده است. در مورد جدایه های جنس *Trichoderma* هویت گونه از طریق مقایسه داده های توالی ایجاد شده در این تحقیق با داده های توالی پایگاه تاکسونومی تریکودرما با استفاده از نرم افزار برخط TrichoBLAST (http://www.isth.info/tools/blast/index.php) تعیین گردید. شناسایی سه جدایه‌ی قارچی (A، Ta و Tb) با استفاده از داده‌های توالی ناحیه ITS در سطح گونه امکان پذیر شد، در حالیکه در مورد جدایه های G و S1 شناسایی گونه براساس توالی این ناحیه امکان پذیر نگردید (جدول ۱). علاوه بر این، هویت گونه‌های *Trichoderma* بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی پرگنه و خصوصیات میکروسکوپی ساختارهای کنیدیوم-زایی مورد تایید قرار گرفت (گمس و بیست ۱۹۹۸).

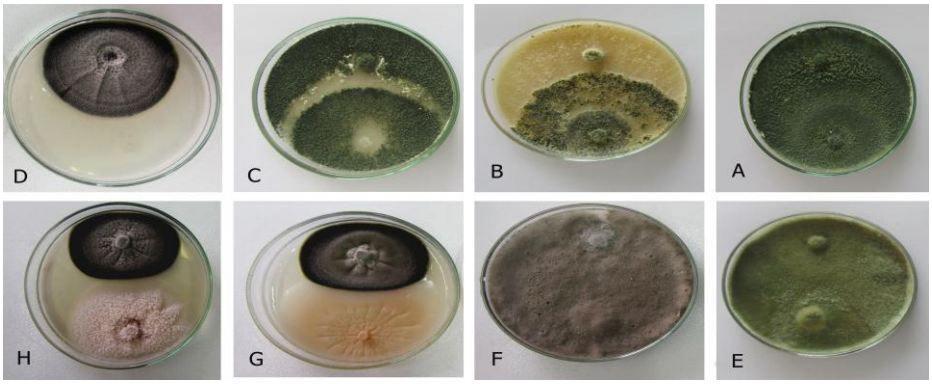
نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی با دو جدایه‌ی قارچ *C. beticola* به روش کشت متقابل

بسته به جنس قارچ آنتاگونیست، سه الی ۱٤ روز پس از کشت متقابل، بین میسلیوم‌های قارچ آنتاگونیست و قارچ بیماری‌زای گیاهی منطقه تعامل تشکیل گردید. در کشت متقابل جدایه‌های آنتاگونیست (Ta و S1) با جدایه-های سرکوسپورا (M1 و M2) در ناحیه به هم رسیدن دو پرگنه، نوار باریکی به صورت ناحیه‌ی بدون پرگنه مشاهده گردید، در حالیکه در کشت های متقابل جدایه-های آنتاگونیست Tb، T22 و Ha با جدایه‌های M1 و M2 هم‌پوشانی پرگنه‌های دو قارچ مشاهده گردید. در تیمارهای A و G با M1 و M2 در هم رفتگی پرگنه‌های دو قارچ مشهود بود. نتایج حاصل از محاسبه میانگین بازدارندگی تیمارها و مقایسه آن‌ها نشان داد که بیشترین درصد بازدارندگی در تعامل بین جدایه‌ی قارچ بیماری‌زای M1 با جدایه T22 بود که میانگین مقدار آن ۹۲/۲٪ محاسبه گردید. کمترین درصد بازدارندگی در تعامل بین جدایه‌ی قارچ بیماری‌زای M1 با جدایهA بود که میانگین مقدار آن ۱۵/۲۱٪ محاسبه گردید. در مورد جدایه قارچ M2 بیشترین درصد بازدارندگی در تعامل با T22 مشاهده گردید و میانگین مقدار آن‌ها ۹۲/۱۸٪ محاسبه گردید. کمترین میزان بازدارندگی رشد در تعامل

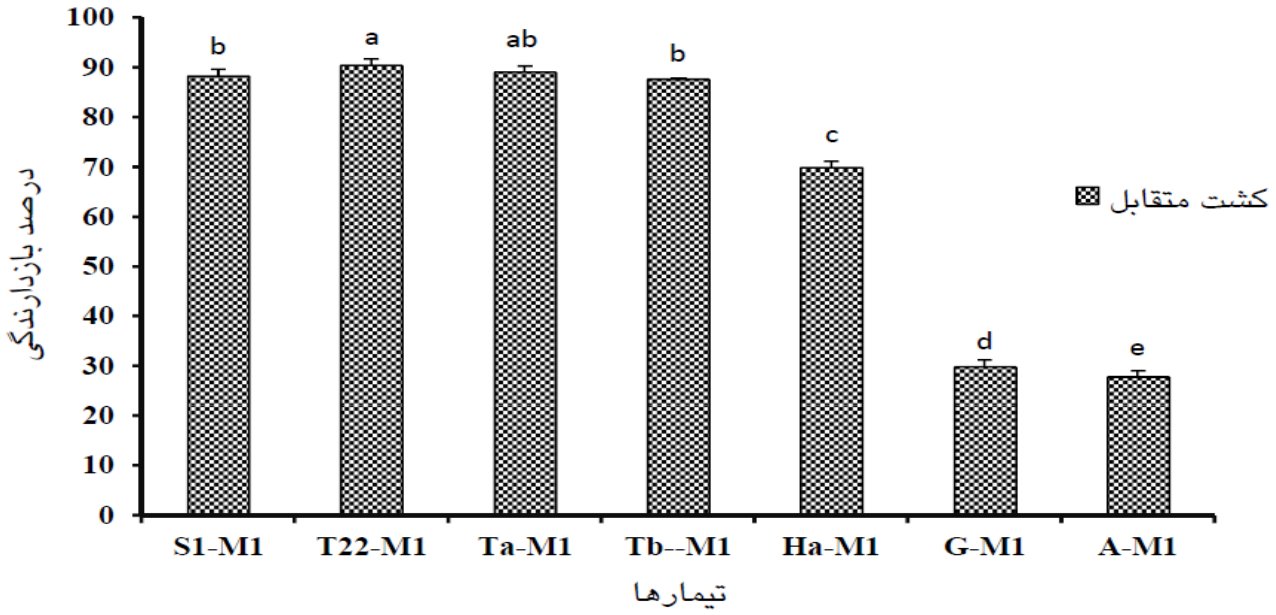
با (G) ارزیابی شد که میانگین مقدار آن ۳۹/۵۸٪ محاسبه گردید (شکل‌های ۱، ۲ و۳، جدول ۲).

جدول ۱- لیست و منشاء جدایه‌های قارچی آنتاگونیست به کار گرفته شده در این تحقیق علیه *Cercospora beticola*، عامل بیماری لکه برگی سرکوسپورایی چغندرقند.

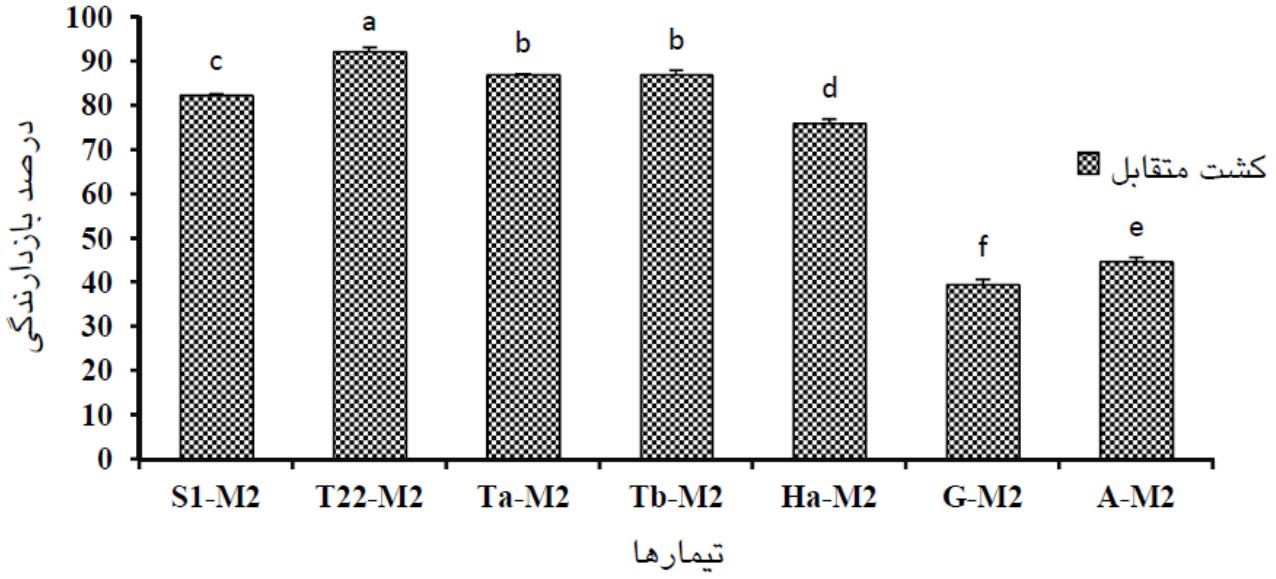
منشاء جدایه	نام قارچ	کد جدایه
کلکسیون آزمایشگاه قارچ شناسی	*Hansfordia pulvinata*	Ha
کلکسیون آزمایشگاه قارچ شناسی	*Trichoderma* sp.	S1
کلکسیون آزمایشگاه قارچ شناسی	*Trichoderma harzianum*	T22
ریزوسفر گیاه چغندرقند	*Trichoderma harzianum*	Ta
ریزوسفر گیاه چغندرقند	*Trichoderma harzianum*	Tb
ریزوسفر گیاه چغندرقند	*Gliocephalis* sp.	G
ریزوسفر گیاه چغندرقند	*Acremonium strictum*	A



شکل ۱- اثر متقابل قارچ‌های آنتاگونیست مختلف با قارچ *Cercospora beticola* در کشت متقابل. A، B و E: هم پوشانی قارچ‌های آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* (Tb، Ta و T22) را به ترتیب نشان می دهد. F: هم پوشانی قارچ آنتاگونیست *Hansfordia pulvinata* (Ha) با قارچ عامل بیماری، C: ناحیه بدون پرگنه قارچ آنتاگونیست *Trichoderma* sp. (S1) با قارچ عامل بیماری، G و H: به ترتیب در هم رفتگی پرگنه‌های قارچ‌های آنتاگونیست *Gliocephalis* sp. (G) و *Acremonium strictum* با قارچ عامل بیماری، D: شاهد در کشت متقابل.



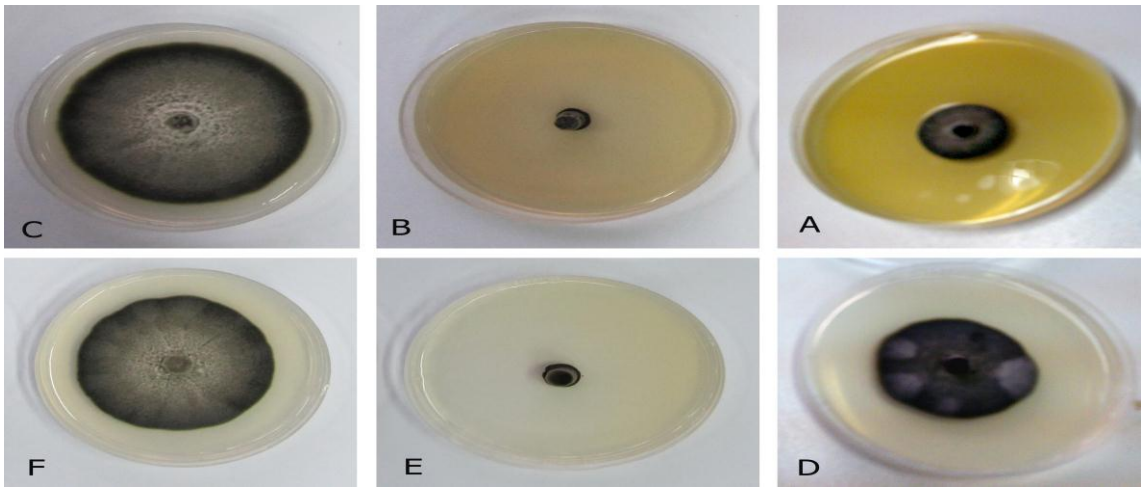
شکل ۲- درصد بازدارندگی از رشد جدایه‌ی **M1** قارچ ***Cercospora beticola*** به وسیله جدایه‌های قارچی آنتاگونیست ***Trichoderma* sp.** (**S1**)، ***Trichoderma harzianum*** (**Tb**، **Ta** و **T22**)، ***Gliocephalis* sp.** (**G**) و ***Acremonium strictum*** (**A**) در کشت متقابل. حروف مشابه بیانگر فقدان اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها در سطح احتمال یک درصد می باشد.



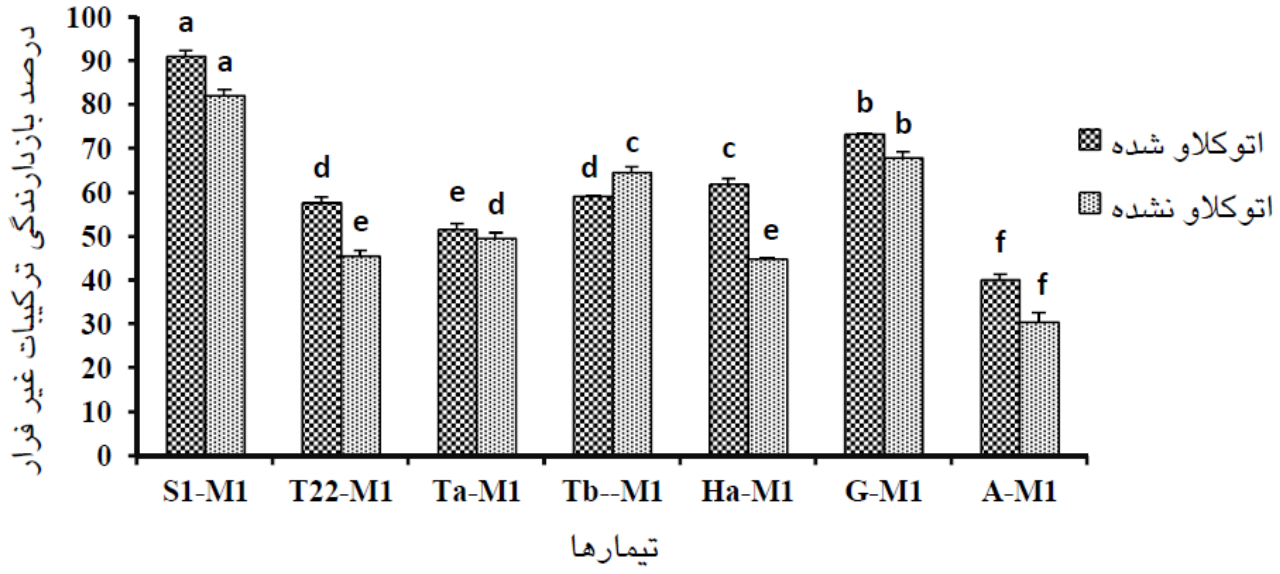
شکل ۳- درصد بازدارندگی از رشد جدایه **M2** قارچ ***Cercospora beticola*** به وسیله جدایه‌های قارچی آنتاگونیست ***Trichoderma* sp.** (**S1**)، ***Trichoderma harzianum*** (**Tb**، **Ta** و **T22**)، ***Gliocephalis* sp.** (**G**) و ***Acremonium strictum*** (**A**) در کشت متقابل. حروف مشابه بیانگر فقدان اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها در سطح احتمال یک درصد می باشد.

اثر متابولیت‌های غیر فرار قارچ‌های آنتاگونیست

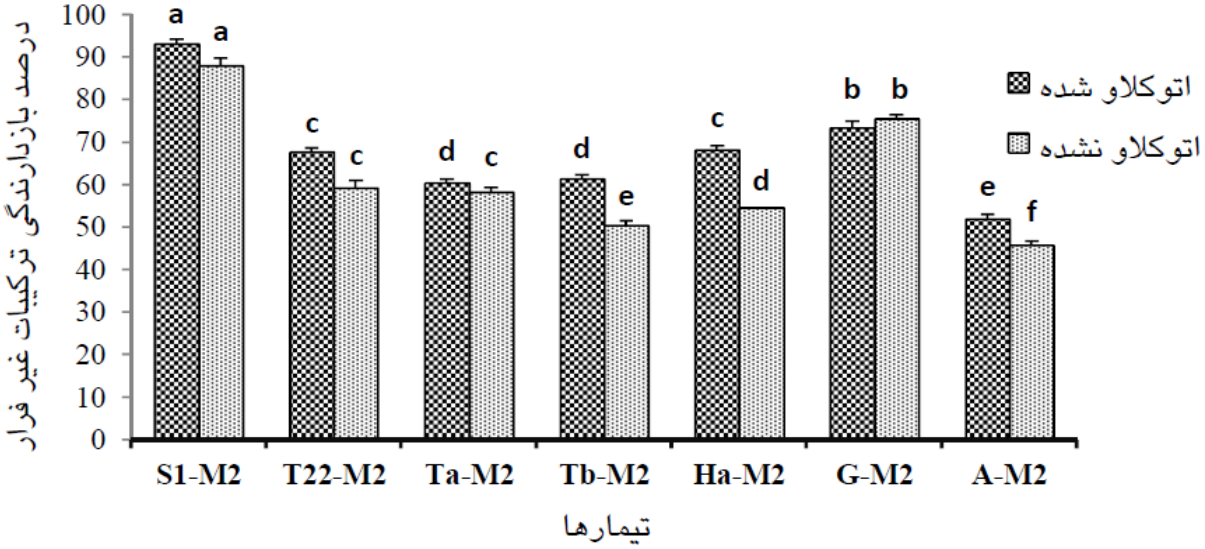
مقایسه‌ی میانگین میزان بازدارندگی دو جدایه‌ی قارچ عامل بیماری‌زای گیاهی (M1 و M2) توسط مواد غیرفرار و آنتی‌بیوتیک‌های ترشح شونده قارچ های آنتاگونیست نشان داد که رشد دو جدایه‌ی مورد مطالعه به طور معنی‌داری توسط غلظت ۷۵ درصدی به صورت اتوکلاو نشده و ۱۰۰ درصدی به صورت اتوکلاو شده مواد غیر فرار و آنتی‌بیوتیک‌های ترشح شونده قارچ آنتاگونیست محدود شد. در این میان بیشترین درصد کاهش رشد جدایه بیماری‌زای (M1) در برابر مواد غیر فرار و آنتی‌بیوتیک‌های ترشح شونده قارچ آنتاگونیست (S1) به صورت اتوکلاو شده ۹۱/۱۵٪ و کمترین درصد کاهش رشد آن در برابر جدایه (A) ۴۰/۱۳٪ محاسبه گردید. بیشترین درصد کاهش جدایه‌ی بیماری‌زای (M2) در برابر مواد غیر فرار و آنتی‌بیوتیک‌های ترشح شونده قارچ آنتاگونیست (S1) به صورت اتوکلاو شده ۹۳/۲۲٪ و کمترین درصد کاهش رشد آن در برابر جدایه (A) ۵۲٪ محاسبه گردید. بیشترین درصد کاهش رشد جدایه بیماری‌زای (M1) در برابر مواد غیر فرار و آنتی بیوتیک-های ترشح شونده قارچ آنتاگونیست (S1) به صورت اتوکلاو نشده ۸۲/۳۱٪ و کمترین درصد کاهش آن در برابر جدایه (A) ۳۰/۶۱٪ محاسبه گردید. بیشترین درصد کاهش رشد جدایه بیماری‌زای (M2) در برابر مواد غیر فرار و آنتی بیوتیک‌های ترشح شونده قارچ آنتاگونیست (S1) به صورت اتوکلاو نشده ۸۰٪ و کمترین درصد کاهش آن در برابر جدایه (A) ۴۵/۸۳٪ محاسبه گردید (شکل ۷). بنابراین می‌توان گفت که متابولیت‌های غیر فرار و آنتی بیوتیک‌های ترشح شونده جدایه (S1) در حالت‌های اتوکلاو شده و اتوکلاو نشده بیشترین تاثیر را در ممانعت از رشد هر دو جدایه‌ی بیمارگر نشان دادند و کمترین تاثیر در ممانعت از رشد هر دو جدایه بیمارگر مربوط به جدایه انتاگونیست (A) بوده است (شکل‌های ٤، ٥ و ٦، جدول ٢).



شکل ٤- اثرمتابولیت‌های غیر فرار قارچ آنتاگونیست *Trichoderma* sp. (S1) در دو حالت اتوکلاو شده و اتوکلاو نشده روی قارچ *Cercospora beticola*. A و B: کمترین و بیشترین اثر متابولیت‌های قارچ آنتاگونیست (S1) در حالت اتوکلاو شده، D و E: کمترین و بیشترین اثر متابولیت قارچ آنتاگونیست (S1) در حالت اتو کلاو نشده، C و F: شاهد.



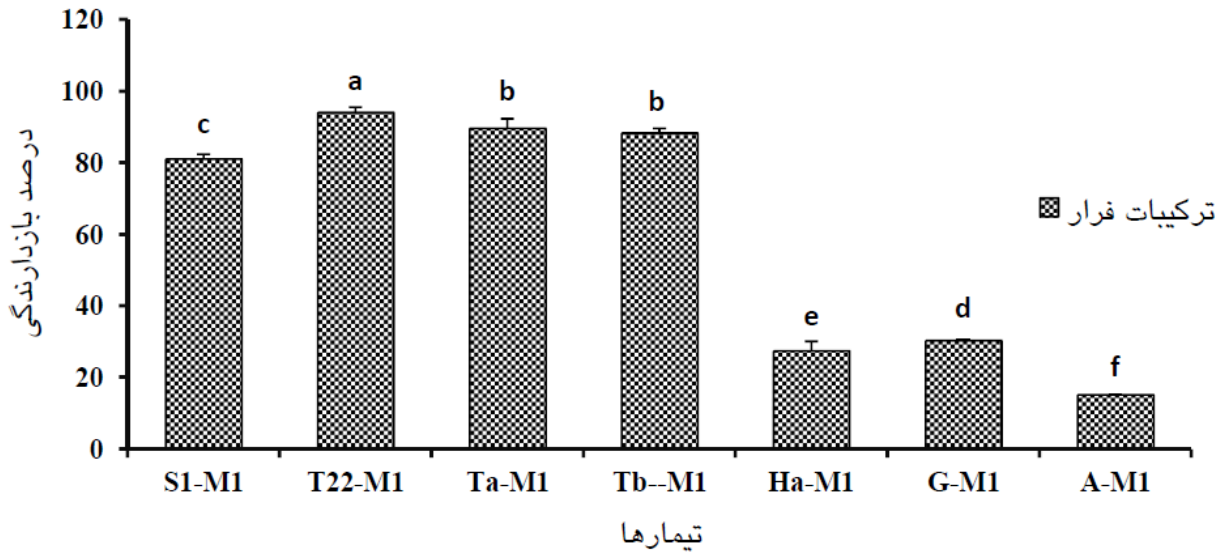
شکل ۵- درصد بازدارندگی از رشد جدایه M1 قارچ *Cercospora beticola* به وسیله ترکیبات غیر فرار جدایه‌های قارچی آنتاگونیست جدایه‌های قارچی آنتاگونیست *Trichoderma* آنتاگونیست *Trichoderma* sp. (S1)، *Trichoderma harzianum* (Tb، Ta و T22)، *Gliocephalis* sp. (G) و *Acremonium strictum* (A) در دو حالت اتوکلاو شده و اتوکلاو نشده. حروف مشابه بیانگر فقدان اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.



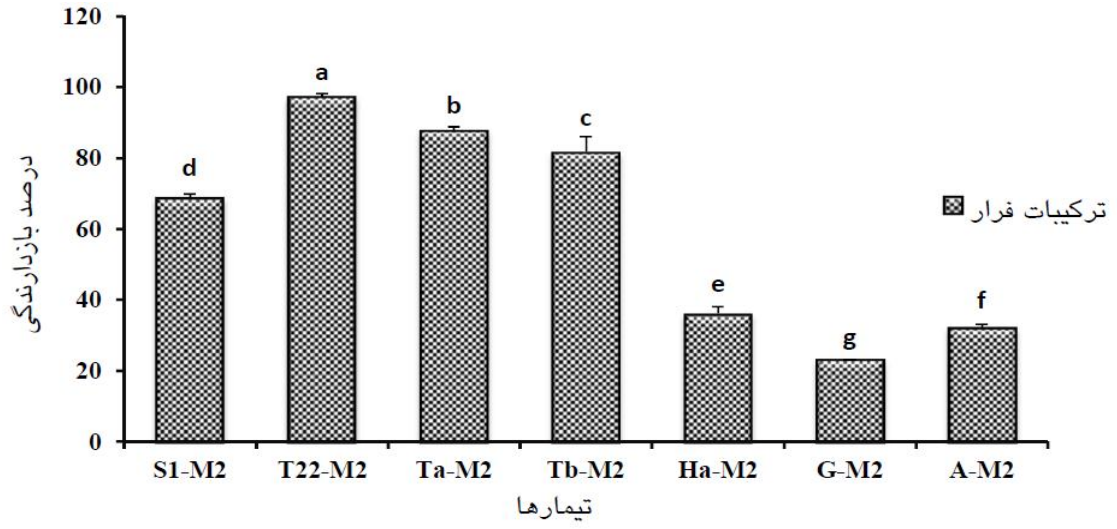
شکل ٦- درصد بازدارندگی از رشد جدایه M2 قارچ *Cercospora beticola* به وسیله ترکیبات غیر فرار جدایه‌های قارچی آنتاگونیست جدایه‌های قارچی آنتاگونیست *Trichoderma* آنتاگونیست *Trichoderma* sp. (S1)، *Trichoderma harzianum* (Tb، Ta و T22)، *Gliocephalis* sp. (G) و *Acremonium strictum* (A) در دو حالت اتوکلاو شده و اتوکلاو نشده. حروف مشابه بیانگر فقدان اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.

اثر متابولیت‌های فرار توسط قارچ آنتاگونیست

در بررسی تاثیر مواد فرار ترشح شونده از جدایه-های قارچ آنتاگونیست بر روی رشد قارچ بیماری‌زا، بیشترین درصد بازدارندگی رشد مربوط به مواد فرار ترشح شونده از جدایه آنتاگونیست (T22) در برابر قارچ بیمارگر (M1) به میزان ۹٤/۲٪ محاسبه گردید و کمترین میزان آن مربوط به مواد فرار ترشح شونده از جدایه آنتاگونیست (A) در تیمار با جدایه بیمارگر (M1) به میزان ۱۵/۲۱٪ مشاهده گردید. بیشترین درصد بازدارندگی رشد مربوط به مواد فرار ترشح شونده از جدایه آنتاگونیست (T22) در برابر قارچ بیمارگر (M2) به میزان ۹۷/۲۲٪ محاسبه گردید و کمترین میزان آن مربوط به مواد فرار ترشح شونده از جدایه آنتاگونیست (G) در تیمار با جدایه بیمارگر (M2) به میزان ۲۳/۳۳٪ مشاهده گردید. این در حالی است که مواد فرار ترشح شونده از جدایه آنتاگونیست (T22) بیشترین بازدارندگی قارچ *C. beticola* را باعث گردید (شکل های ۷ و ۸، جدول ۲).



شکل ۷- درصد بازدارندگی از رشد جدایه M1 قارچ *Cercospora beticola* به وسیله ترکیبات فرار جدایه‌های قارچی آنتاگونیست جدایه‌های قارچی آنتاگونیست *Trichoderma* sp. (S1)، *Trichoderma harzianum* (Tb، Ta و T22)، *Gliocephalis* sp. (G) و *Acremonium strictum* (A) در دو حالت اتوکلاو شده و اتوکلاو نشده. حروف مشابه بیانگر فقدان اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.



شکل ۸- درصد بازدارندگی از رشد جدایه M2 قارچ *Cercospora beticola* به وسیله ترکیبات فرار جدایه‌های قارچی آنتاگونیست جدایه‌های قارچی آنتاگونیست *Trichoderma* sp. (S1)، *Trichoderma harzianum* (Tb، Ta و T22)، *Gliocephalis* sp. (G) و *Acremonium strictum* (A) در دو حالت اتوکلاو شده و اتوکلاو نشده. حروف مشابه بیانگر فقدان اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.

جدول ۲- میانگین درصد بازدارندگی جدایه‌های قارچ آنتاگونیست از رشد جدایه‌های M1 و M2 قارچ بیمارگر *Cercospora beticola* در سطح احتمال یک درصد.

جدایه‌های عامل بیماری	جدایه‌های آنتاگونیست	کشت متقابل	ترکیبات فرار	ترکیبات غیر فرار	
				اتوکلاو شده	اتوکلاو نشده
M1	S1	۸۸/۴۳b	۸۱/۱۵c	۹۱/۱۵a	۸۲/۳۱a
M1	T22	۹۰/۴۷a	۹۴/۲e	۵۷/۸۲d	۴۵/۵۷e
M1	Ta	۸۹/۱۱ab	۸۹/۸۵b	۵۱/۷e	۴۹/۶۵d
M1	Tb	۸۷/۷۵b	۸۸/۴b	۵۹/۱۸d	۶۴/۶۲c
M1	Ha	۷۰c	۲۷/۵۳e	۶۱/۹c	۴۴/۸۹a
M1	G	۳۰/۴۳d	۳۰/۴۳d	۷۳/۴۶b	۶۸b
M1	A	۲۷/۸۹e	۱۵/۲۱f	۴۰/۱۳f	۳۰/۶۱f
M2	S1	۸۲/۲۹c	۶۷/۸۸d	۹۳/۲۲a	۸۸a
M2	T22	۹۲/۱۸a	۹۷/۲۲a	۶۷/۷c	۵۹/۳۷c
M2	Ta	۸۶/۹۷b	۸۷/۷۷b	۶۰/۴۱d	۵۸/۳۳c
M2	Tb	۸۶/۹۷b	۸۱/۶۶c	۶۱/۴۵d	۵۰/۵۲e
M2	Ha	۷۶d	۳۳/۱۱e	۶۸/۲۲c	۵۴/۶۸d
M2	G	۳۹/۵۸f	۲۳/۳۳g	۷۳/۴۳b	۷۵/۵۲b
M2	A	۴۴/۷۹e	۳۲/۲۲f	۵۲e	۴۵/۸۳f

*حروف مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

تاثیر جدایه های قارچی آنتاگونیست در کنترل بیماری لکه برگی سرکوسپورایی چغندر قند در شرایط گلخانه

بررسی تاثیر سه جدایه قارچ آنتاگونیست در کنترل بیماری لکه برگی سرکوسپورایی چغندر قند در شرایط گلخانه نشان داد که جدایه‌های آنتاگونیست در هر سه حالت کاربرد (تلقیح همزمان آنتاگونیست و بیمارگر، تلقیح اول آنتاگونیست بعد بیمارگر و تلقیح اول بیمارگر بعد آنتاگونیست) به طور معنی‌داری بیماری را کاهش می‌دهند در حالی که در تیمار گیاهان شاهد سالم و تلقیح شده با آنتاگونیست آثار بیماری مشاهده نگردید. در هر سه حالت تلقیح، بیشترین درصد بازدارندگی را جدایه‌ی T22 به خود اختصاص داد (جدول ۳). میزان درصد کنترل همه جدایه‌ها در شرایط گلخانه نسبت به شرایط آزمایشگاه بیشتر بود که این می‌تواند ناشی از شرایط انجام آزمایش و سازگاری عامل آنتاگونیست با شرایط فیزیکوشیمیایی و اکولوژی خاک و میزبان باشد. بین حالت های مختلف تلقیح از نظر میزان کنترل بیماری تفاوت هایی مشاهده گردید، به طوریکه بیشترین کاهش در میزان بیماری در هر سه تیمار (T22، S1، Ta) در دو حالت تلقیح همزمان آنتاگونیست و پاتوژن و تلقیح اول آنتاگونیست بعد بیمارگر حاصل گردید. تلقیح آنتاگونیست بعد از استقرار عامل بیماری کمترین میزان کاهش بیماری را سبب گردید (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین درصد بازدارندگی سه جدایه قارچ آنتاگونیست در جلوگیری از پیشرفت بیماری لکه برگی سرکوسپورایی در شرایط گلخانه در سطح احتمال یک درصد.

جدایه‌های آنتاگونیست	تلقیح هم زمان پاتوژن و آنتاگونیست	اول پاتوژن بعد آنتاگونیست	اول آنتاگونیست بعد پاتوژن
T 22	**۹۳/۹a**	**۷۸/۹٤a**	**۹٤a**
S1	**۹۱/٦۲b**	**٦۸/۱۱b**	**۸۹/٦۹b**
Ta	**۸۳/۳۹c**	**۵۷/۵۳c**	**۸۵/۷۲c**

***حروف مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.**

بحث

نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی پتانسیل قارچ‌های آنتاگونیست در رقابت با عامل بیماری لکه برگی سرکوسپورایی چغندر قند، نشان داد که همه جدایه-های مورد مطالعه قارچ‌های آنتاگونیست در مقایسه با شاهد اثر بازدارندگی رشد معنی داری بر روی قارچ بیماری‌زا دارند. در روش کشت متقابل، جدایه‌های آنتاگونیست با استفاده از مکانیسم‌های مختلف بازدارندگی باعث محدود شدن رشد *C. beticola* بر روی محیط کشت شدند. هم چنین تمام جدایه‌های قارچ های آنتاگونیست قادر به رشد و پیشروی روی میسیلیوم قارچ عامل بیماری بودند. بیشترین درصد بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری مربوط به جدایه‌ی T22 به میزان۹۲/۱۸ درصد بوده است. این نتایج با نتایج تحقیقات بورمستر (۲۰۰۸) انطباق دارد.

مکانیسم تاثیر جدایه‌های مختلف *Trichoderma* علیه عوامل بیماری‌زای گیاهی مختلف توسط محققین متعددی بررسی شده است (لوریتو و همکاران ۱۹۹٦، دمارکو و همکاران ۲۰۰۳، ماچ و زیلینگر ۲۰۰۳، استفانیا و همکاران ۲۰۰۸، پیغامی ۱۳۸۰، عبدالله زاده و همکاران ۱۳۸۵). این محققین وجود پدیده‌هایی چون پارازیتیسم، آنتی بیوز و رقابت را به عنوان مکانیسم های آنتاگونیستی مهم *Trichoderma* متذکر شده‌اند. در بررسی‌های مربوط به آنتی بیوز، در این تحقیق دو آزمون بررسی اثر متابولیت‌های فرار و غیر فرار جدایه های آنتاگونیست علیه *C. beticola* انجام گرفت. این

آزمون مشخص کرد که جدایه‌های مختلف آنتاگونیست از نظر تولید مواد فرار و غیر فرار و ممانعت از رشد قارچ میزبان متفاوتند. به همین دلیل بعضی از جدایه های آنتاگونیست تاثیر بیشتری در ممانعت از رشد *C. beticola* داشتند. این نتایج با داده های دیاکون (۱۹۹۱) مطابقت دارد.

آزمایش بررسی متابولیت‌های مایع خارج سلولی جدایه‌های آنتاگونیست نشان داد که تولید ترکیبات غیر فرار، مکانیسم آنتاگونیستی مهم بر علیه بیمارگر می باشد. نتایج تحقیقات در این زمینه نشان دهنده تاثیر مهم ترکیبات این قارچ‌ها در کنترل عوامل بیماری زا است (دمارکو و همکاران ، ۲۰۰۰، ۲۰۰۳). با توجه به اینکه جدایه T22 در آزمایش ها به غیر از آزمایش ترکیبات غیرفرار نسبت به جدایه‌های دیگر آنتاگونیست درصد بازدارندگی بیشتری در رشد قارچ عامل بیماری نشان داده، می توان چنین استنباط کرد که جدایه‌های مختلف هر کدام ممکن است در یک یا چند مکانیسم از مکانیسم‌های آنتاگونیستی به صورت قوی عمل کنند در حالی که در مکانیسم‌های دیگر ضعیف باشند (زپا و همکاران ۱۹۹۱).

نتایج بررسی تاثیر جدایه‌های *Trichoderma* در کنترل بیماری در شرایط گلخانه نشان داد، هر چهار جدایه قارچی قادر به کاهش میزان بیماری می‌باشند. دو جدایه *Trichoderma harzianum* (Ta و Tb) از خاک ریزوسفر گیاهان چغندر قند در منطقه مغان طی تحقیق حاضر جداسازی گردیدند و دو جدایه دیگر شامل *Trichoderma* sp. (S1) که از تنه درخت چنار با علایم پوسیدگی در مطالعات قبلی جداسازی شده بود و یک جدایه تجاری *Trichoderma harzianum* (T22)، از کلکسیون کشت های زنده آزمایشگاه قارچ شناسی تکمیلی دانشگاه تبریز دریافت و مورد استفاده واقع شدند. نتایج بررسی نشان داد که جدایه (Ta) در مقایسه با جدایه تجاری (T22) و جدایه (S1) از پتانسیل بازدارندگی کمتری برخوردار می باشد. بیشترین میزان کاهش بیماری مربوط به جدایه تجاری *Trichoderma* و به‌دنبال آن جدایه (S1) بود (جدول ۳). با توجه به سابقه طولانی کشت چغندرقند در منطقه مغان، کارایی پایین جدایه (Ta) ممکن است ناشی از سازگاری بین عامل بیماری و آنتاگونیست در دراز مدت باشد. جدایه های *Trichoderma* می‌توانند در خاک ناحیه ریزوسفر چغندرقند و حتی روی برگ‌های چغندر در شرایط مختلف زنده بمانند (استفانیا و همکاران، ۲۰۰۸). به نظر می‌رسد کاربرد *Trichoderma* در مرحله نکروتروفیک چرخه بیماری موثر باشد. در واقع کاهش اسپورزایی بعد از کاربرد *Trichoderma* می‌تواند ناشی از رقابت بین دو میکروارگانیسم برای کلونیزه کردن لکه‌های نکروتیک باشد (کوهل و فوکما، ۱۹۹۸). برای مقابله با آلودگی-های اولیه و در مراحل بعد استفاده از فرمولاسیونهای مبتنی بر *Trichoderma* با هدف کاهش اینوکلوم ثانویه که ناشی از اسپورزایی روی لکه نکروزه است انجام می‌گیرد زیرا کاهش منابع اسپوری یک پارامتر بسیار مهم در کنترل *C. beticola* در نظر گرفته شده است (روسی و همکاران، ۲۰۰۰). به نظر می‌رسد استفاده از جدایه های *Trichoderma* و عوامل آنتاگونیست دیگر در کاهش میزان اینوکلوم زمستان گذران عامل بیماری که روی بقایای گیاهی و خاک صورت می‌گیرد موثر باشد (لارتی ۲۰۰۳).

زمان تلقیح جدایه‌های آنتاگونیست در میزان بازدارندگی از توسعه بیماری در شرایط گلخانه موثر بود. در این تحقیق جدایه‌های آنتاگونیست در سه حالت همزمان با بیمارگر، اول آنتاگونیست بعد بیمارگر و اول بیمارگر بعد آنتاگونیست مورد ارزیابی قرار گرفتند . نتایج بررسی نشان داد در مورد هر سه جدایه آنتاگونیست دو حالت تلقیح همزمان آنتاگونیست با بیمارگر و اول آنتاگونیست بعد بیمارگر کنترل بهتری را ایجاد می کنند (جدول ۳). علت امر را می توان به نقش *Trichoderma* در تحریک سیستم دفاعی میزبان نسبت داد. بررسی‌ها نشان داده که عملکرد بهتر برخی جدایه‌های *Trichoderma* روی محصول می‌تواند ناشی از القای مقاومت سیستمیک[1] (SAR) در میزبان باشد و این راه‌کار به عنوان یکی از مهمترین مکانیسم

[1]Systemic Acquired Resistance (SAR).

های عمل این عامل کنترل زیستی، برای انواع سیستم-های بیمارگر گیاهی گزارش شده است (هارمن و همکاران، ۲۰۰٤). استفانیا و همکاران (۲۰۰۸) نیز با موفقیت از *Trichoderma* برای کنترل *C. beticola* عامل لکه برگی سرکوسپورایی چغندر قند استفاده کرده‌اند.

به طور کلی نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که جدایه‌های قارچی انتاگونیست در شرایط آزمایشگاه و گلخانه از پتانسیل لازم برای محدود کردن رشد قارچ *C. beticola* برخوردار می باشند. بررسی‌های تکمیلی در خصوص کارایی این جدایه‌ها در کنترل بیماری در شرایط مزرعه و انتخاب جدایه و یا جدایه‌های برتر آنتاگونیست در راستای تهیه فرمولاسیون تجاری ضروری می‌باشد.

منابع

ارشاد ج، ۱۳۸۸ . قارچ‌های ایران. ویراست سوم. انتشارات موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، ۸٤۷ صفحه.

بخشی م، ارزنلو م و بابای اهری الف، ۱۳۹۱. تعیین تیپ های قارچ*Cercospora beticola* عامل بیماری لکه‌برگی چغندر قند با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و امکان تشکیل مرحله جنسی ان در شرایط آزمایشگاه. مجله پژوهشهای کاربردی در گیاهپزشکی جلد ۱ شماره ۱. صفحه‌های ۱۵ تا ۲۷.

پیغامی الف، ۱۳۸۰. بررسی اثر آنتاگونیستی چند جدایه *Trichoderma* روی عوامل قارچی پوسیدگی ریشه پیاز در آذربایجان شرقی. مجله علوم کشاورزی ایران جلد ۳۲، شماره ٤. صفحه‌های ۷٤۵ تا ۷۵۵.

خدایی س، ارزنلو م، بابای اهری االف و ولیزاده م، ۱۳۹۲. ارزیابی مقاومت نسبی رقم افتابگردان در برابر گونه *Alternaria alternate*. مجله بیماری های گیاهی ایران جلد ٤۹ شماره ۱. صفحه‌های ۷۷ تا ۸۲.

عبداله‌زاده ج، محمدی گل تپه‌ای الف و روحانی ح، ۱۳۸۵. بررسی امکان کنترل بیولوژیکی عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه آفتابگردان *Sclerotinia sclerotiorum* توسط گونه‌های *Trichoderma* در شرایط آزمایشگاهی. مجله علوم کشاورزی دانشگاه ازاد اسلامی شماره ۱. صفحه‌های ٤۳ تا ۵۵.

Arzanlou M and Bakhshi M, 2011. *Microcyclospora rumicis*, a new species on *Rumex crispus* from Iran. Mycotaxon 118: 181-186.

Bakhshi M, Arzanlou M and Babai-Ahari A, 2012. Comprehensive check list of Cercosporoid fungi from Iran. Plant Pathology and Quarantine 2: 44-55.

Bakhshi M, Arzanlou A, Babai-ahari A, Groenewald JZ, Braun U and Crous PW, 2015. Applying the consolidated species concept to differentiate species of *Cercospora* from Iran. Persoonia 34: 65-86.

Bakhshi M, Arzanlou M and Babai-Ahari A, 2011. Uneven distribution of mating type alleles in Iranian populations of *Cercospora beticola*, the causal agent of Cercospora leaf spot disease of sugar beet. Phytopathologia Mediterranea 50: 101-109.

Burzi P, Cerato C, Galletti S, Marinella S and Sala E, 2008. *Trichoderma* as a potential biocontrol agent for *cercospora* leaf spot of sugar beet. Biological Control 53: 917-930.

Burmeister L, 2008. The antagonistic mechanisms employed by *Trichoderma harzianum* and their impact on the control of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus*. Ph.D. thesis in plant pathology. University of Hannover, Germany.

Collins DP and Jacobsen BJ, 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. Biological Control 26(2): 153-161.

Deacon JW, 1991. Significance ecology in the development of biological agent against soilborne plant pathogens. Biocontrol Science and Technology 1: 5-20.

Dennis C and Webster J, 1971. Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* I, production of non-volatile antibiotics. Transactions of British Mycological Society 57: 25-39.

De Marco JL, Valadares-Inglis MC and Felix CR, 2003. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* sp. isolates with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches broom of cocoa. Brasilian Journal of Microbiology 34(1): 33-38.

Demarco JL, Lima CLH, Desousa MV and Felix CR, 2000. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroy the cell walls of the phytopathogen *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of the witches broom disease of cocoa. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 16: 383-386.

Edington LV, Khew KL and Barron, 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology 61: 42-44.

Games W and Bissett J, 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. Pp. 3-34. In: Kubicek CP and Harman GE, (eds.), *Trichoderma* and *Glicladium*. Vol. 1. Taylor & Francis, London, UK.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I and Lorito M, 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews 2: 43-56.

Holtschulte B, 2000. *Cercospora beticola* worldwide distribution and incidence. Pp: 5–16. In: Asher MJC, Holtschulte B, Richard Molard M, Rosso F, Steinr¨ucken G. Beckers R(Eds). *Cercospora beticola* Sacc. Vol. 2. Biology, Agronomic Influence and Control Measures in Sugar Beet, IIRB, Belgium.

Kohl J and Fokkema NJ, 1998. Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens Pp: 49–88. In: Boland GJ, Kuykendall LD (Eds) Plant-microbe interaction and biological control. Marcel Dekker Inc, New York. Lartey RT, 2003. Friendly fungi help in war against *Cercospora*. http://www.ars.usda.gov.

Lartey RT, 2003. Friendly fungi help in war against *Cercospora*. http://www.ars.usda.gov.

Lorito M, Farkas V, Rebuffat S, Bodo B and Kubicek C, 1996. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. Journal of Bacteriology 187: 6382-6385.

Moller EM, Bahnweg G and Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nuclear Acid Research 20: 6115–6116.

Mach RL and Zeilinger S, 2003. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*, Applied Microbiology and Biotechnology 60: 515-522

Miller J, Rekoske M and Quinn A, 1994. Genetic resistance, fungicide protection and variety approval politics for controlling yield losses from *Cercospora* leaf spot infection. Journal of Sugar Beet Research 31: 7-12.

Rossi V, Battilani P, Chiusa G, Languasco L and Racca P. 1999. Components of rate-reducing resistance to *Cercospora* leaf spot in sugar beet: incubation length, infection efficiency, lesion size. Journal of Plant Pathology 81: 25-35.

Rossi V, Battilani P, Chiusa G, Languasco L and Racca P, 2000. Components of rate-reducing resistance to *Cercospora* leaf spot in sugar beet: conidiation length, spore yield. Journal of Plant Pathology 82: 125–132.

Smith GA, 1985. Response of sugarbeet in Europe and the USA to *Cercospora beticola* infection. Agronomy Journal 77: 126-129.

Stefania G, Pier LB, Simona CCM and Eleonora S, 2008. *Trichoderma* as a potential biocontrol agent for *Cercospora* leaf spot of sugar beet. BioControl 53: 917–930.

White T J, Bruns T, Lee S and Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322 In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.), PCR Protocols : A guide to Methods and Applications Academic Press, New York, USA.

Windels CE, Lamey HA, Hilde D, Widner J and Knudsen T, 1998. A *Cercospora* leaf spot model for sugar beet: in practice by an industry. Plant Disease 82: 716-726.

Zeppa G, Allengron G, Barbeni M and Guarda PA, 1991. Variability in the production of volatile metabolites by *Trichoderma viride*. Review of Plant Pathology 70(8): 604-612.

Inhibitory Potential of Some Fungal Antagonists on *Cercospora beticola* the Causal agent of Cercospora Leaf Spot Disease on SugarBeet, Under Laboratory and Greenhouse Conditions

S Mousavi[1] and M Arzanlou[2*]

[1]Former MSc Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
*Corresponding author: arzanlou@hotmail.com

Received: 23 Jun 2015 Accepted: 31 Aug 2015

Abstract

In this study, antagonistic potential of fungal agents inhabiting rhizosphere of sugarbeet were evaluated against *Cercospora beticola*, the causal agent of sugarbeet leaf spot disease. For this purpose, 15 fungal isolates were recovered from rhizosphere of sugar beet plants. After preliminary screening of their antagonistic potential, three isolates were selected for further antagonistic assay. Isolates were identified based on the sequence data of ITS-rDNA region. The identity of isolates was determined as *Trichoderma harzianum*, *Acremonium strictum* and *Geliocephalis* sp. Three additional antagonistic fungi namely *T. harzianum* (T22), *T. harzianum* (Ta) and *Hansfordia pulivinanta* (Ha) were also included in current experiment. The results obtained in this study showed that all of the antagonists significantly inhibited the growth of *C. beticola* in compare to the control. In dual culture and volatile secondary metabolite assays *T. harzianum* T_{22} showed the highest inhibitory effect and *A. strictum* and *Geliocephalis* showed lowest inhibitory effect on *C. beticola*. In non-volatile secondary metabolite (autoclaved and non- autoclaved) assay, the highest and lowest inhibitory effects were recorded for *T. harzianum* and *A. strictum*, respectively. Antagonistic potential of *Trichoderma* isolates were further evaluated under greenhouse conditions in three different statuses including application of antagonists prior to, simultaneous and after inoculation of *C. beticola* on sugar beet leaves. The obtained results showed that both *Trichoderma* isolates significantly reduced the disease severity in compare to the control.

Keywords: Antagonist, Cercospora leaf spot, ITS-rDNA sequence, Sugar beet.